Aus dem Immunochemischen Eiweißlabor (Leiter: Prof. W. H. Hitzig)
der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. A. Prader)
Gemeinschaftsarbeit: P. Bodmer und W. H. Hitzig

Lymphocyten-Stimulation in vitro mit Phytohämagglutinin. Modifikation bei schwerer Lymphopenie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Universität Zürich

vorgelegt von

Pierre Bodmer

von Maur (Zürich)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. W. H. Hitzig

Zürich 1971

Die Arbeit erschien unter den Autorennamen P. BODMER und W. H. HITZIG
in der Klinischen Wochenschrift, Jg. 49, S. 611-613 (1971)
Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg-New York
© by Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1971

A mes parents et à Colette
en témoignage
de ma profonde reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

https://archive.org/details/IA41507220_0043

Klin. Wschr. 49, 611—613 (1971)
© by Springer-Verlag 1971

Lymphocyten-Stimulation in vitro mit Phytohämagglutinin. Modifikation bei schwerer Lymphopenie*

P. Bodmer und W. H. Hitzig

Immunochemisches Laboratorium (Leiter: Prof. W. H. Hitzig) der Univ.-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. A. Prader)

Eingegangen am 30. November 1970

In Vitro Stimulation of Lymphocyte Transformation with Phytohemagglutinin. Modifications Observed in Severe Lymphopenia.

Summary. Phytohemagglutinin is considered a maximal stimulus for the transformation of lymphocytes. In severely lymphopenic patients, the lymphocytes have been claimed to be non-responsive, i.e. these cells are considered qualitatively deficient.—Systematic study of a severely lymphopenic patient demonstrated that his lymphocytes are normally responsive to the phytohemagglutinin stimulus, provided the greatly disturbed relationship between granulocytes and lymphocytes is restored. Several possible explanations are discussed. It is most probable that during the short-time culture the granulocytes are destroyed, thus releasing their hydrolases into the culture medium and so inhibiting the lymphocytes.

Zusammenfassung. Phytohämagglutinin gilt als maximaler Stimulus zur Einleitung der Transformation von Lymphocyten. Bei schwerer Lymphopenie wurde eine verminderte Stimulierbarkeit der Lymphocyten behauptet, d.h. ein qualitativer Defekt dieser Zellen.

Bei der systematischen Untersuchung eines schwer lymphopenischen Patienten konnte gezeigt werden, daß nach Angleichung der gestörten Relation zwischen Granulocyten und Lymphocyten die letzteren normal auf Phytohämagglutinin ansprechen. Die wahrscheinlichste Erklärung liegt darin, daß die Granulocyten zugrunde gehen und dabei ihre Hydrolasen in das Kulturmedium freigeben; dadurch dürften die Lymphocyten gehemmt werden.

1. Einleitung

Die cellulären immunologischen Funktionen sind bedeutend schwieriger zu beurteilen als die humoralen Faktoren. Die üblichen Verfahren (Prüfung der Reaktionen vom verzögerten Typ mit Intra- oder Percutanproben, homologe Hauttransplantate) exponieren und belasten den Patienten. Einen wesentlichen Fortschritt bedeutete daher die Einführung der in vitro-Probe, die in der Stimulation der Blutlymphocyten mit dem Bohnenextrakt Phytohämagglutinin (PHA) besteht. Besonders wichtig sind derartige, wenn möglich quantitative, Prüfungen bei Verdacht auf kongenitale Immundefekte. Bei den bisher untersuchten Fällen von kongenitaler Alymphocytose wurde die Stimulierbarkeit der Blutlymphocyten durch PHA durchwegs stark abgeschwächt gefunden; es war deswegen schwierig oder unmöglich, Mitosen zur Chromosomenuntersuchung zu finden [3, 6, 7].

Bei der genauen Untersuchung eines schwer lymphopenischen Patienten fanden wir, daß seine Lymphocyten bei geeigneter Versuchsanordnung, d.h. vor allem Anreicherung in genügendem Reinheitsgrad, normal stimulierbar waren. Der klinische Defekt ist demnach rein quantitativer, jedoch nicht qualitativer Natur. — Wegen der beträchtlichen prinzipiellen Bedeutung dieser Behauptung möchten wir die in unserem Laboratorium entwickelte und angewendete Technik ausführlich beschreiben.

2. Kasuistik

Der Patient (Gion B., geb. 20. 3. 68) stammte aus einer uns bekannten Familie, in der bereits 2 Knaben an einem lymphopenischen Antikörpermangelsyndrom gestorben waren. Der Patient selbst hatte ebenfalls von Geburt an eine schwere Lymphopenie. Die PHA-Stimulation der Blutlymphocyten wurde im Alter von 7½ Monaten (7. 11. 68) und von 9 Monaten (20. 12. 68) geprüft. Der Patient kam schließlich im Alter von 14 Monaten ad exitum (in extenso dargestellt in [4]).

3. Spezialuntersuchungen

Ausgehend von der Methode von Bach und Voynow [1] wurde unsere Modifikation für die Lymphocytenstimulation mit PHA ausgearbeitet:

Prinzip. Die lymphocytenreiche Leukocyten-Suspension wird in PHA-haltigem Kulturmedium bei 37°C für 60 Std inkubiert. Dann wird eine bestimmte Menge des radioaktiven Nucleosids H^3-Thymidin zugegeben und anschließend weitere 6 Std bei 37°C inkubiert. Das in die transformierten Lymphocyten aufgenommene tritiumhaltige Thymidin wird schließlich im liquid scintillation counter quantitativ gemessen. — Die besondere Schwierigkeit beim Patienten bestand darin, daß bei 2900 Leukocyten pro µl nur 6% Lymphocyten (= 174/µl) zur Verfügung standen. In einem typischen Versuch (20. 12. 68) gingen wir deshalb folgendermaßen vor:

In 25 ml steril entnommenem Heparinblut konnte bei 50% Verlust nur mit einer totalen Lymphocytenzahl von ca. 2 Millionen gerechnet werden. Da mehrere Kulturen angelegt werden sollen, mußten wir die unter den üblichen Versuchsbedingungen optimale Zahl von 1—2 Millionen Lymphocyten pro Kultur vermindern. Auch die mitgeführten Kontrollen D. B. und E. B. wurden mit entsprechend geringeren Lymphocytenzahlen pro Kultur angesetzt.

Vorgehen. Die Erythrocytensedimentation wurde durch Zusatz von 4 ml einer 3%igen Dextranlösung (MG 250000) in physiologischer Salzlösung beschleunigt. Eine Portion (18 ml) dieser Mischung wurde vor der Sedimentation über eine mit Nylonwatte (Grilon, Emserwerke, Tamins/GR) gefüllte Säule (Länge 10 cm, Durchmesser 2 cm) filtriert. Die Nylonwatte wurde vorgängig mit TC-Hanks-Lösung (Difco) eingeweicht und auf 37°C vorgewärmt. Das filtrierte Blut wurde dann bei 37°C während 30 min in senkrecht aufgestellten Plastikspritzen der Spontansedimentation überlassen. — Das restliche Blut-Heparin-Dextrangemisch (10 ml) wurde ohne Filtration zur Sedimentation bei 37°C aufgestellt.

Die beiden Blutproben sowie die Kontrollen wurden gleich weiter verarbeitet: das leukocytenreiche überstehende Plasma wurde vorsichtig durch die um 120° abgehobene Nadel in sterile Polystyrolröhrchen (Falcon Plastics Gewebekulturröhrchen Nr. 3033, 16 × 125 mm) abgepreßt und dann 10 min bei 150 g zentrifugiert. Der thrombocytenreiche Überstand wurde verworfen, das Sediment mit serologischen Pipetten (Falcon Plastics Nr. 7521 à 1 ml) schonend in TC-Hanks-Lösung resuspendiert und in gleicher Weise 2mal gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1—2 ml Kulturmedium ohne PHA-Zusatz suspendiert. Eine Probe dieser Stammlösung wurde nach Samson gefärbt, ausgezählt und differenziert.

Pro Kulturröhrchen wurden 130000—750000 Lymphocyten mit 2,5 ml PHA-haltigem Kulturmedium[1] angesetzt, mit dem Schraubdeckel luftdicht verschlossen und bei 37°C inkubiert. Nach 60 Std wurden pro Kultur 2 Micro Curie tritiertes Thymidin (spec. act. 1,9 mc/mmol, Schwarz Bioresearch) zugefügt. 6 Std (37°C) später Zusatz von 0,1 ml einer 0,25%igen Lösung von nicht radioaktivem Thymidin. Dann Zentrifugieren bei 1000 g, Verwerfen des Überstandes und Aufwirbeln der Zellen auf dem Vortex-Mixer in 5 ml 5%iger Trichloressigsäure. Der nun denaturierte Zellrückstand wurde nach nochmaligem scharfen Zentrifugieren in 1 ml 0,1 N Natronlauge aufgelöst. — Nach verlustfreiem Umleeren in die Gefäße des Flüssigkeitszählers wurde die grünlich gefärbte Lösung mit einigen Tropfen 30%igem Wasserstoffsuperoxyd entfärbt (zur Verbesserung der Zählausbeute bei der Szintillationszählung), und nun mit 4,5 ml 6,7%iger Trichloressigsäure versetzt: die ausgefallenen Proteine wurden durch scharfe Zentrifugation vom Überstand

* Arbeit mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

1 Kulturmedium: 100 ml Basal Medium Eagle (Diploid) Gibco Nr. G 13 + 2 ml Heparin (Liquemin Roche) + 1 ml 10%iges Natriumbicarbonat + 1 ml antibiotic-antimycotic solution Gibco Nr. 524 (10000 E Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 mcg Fungizone) + 25 ml AB Mischserum + einige Tropfen Phenolrot als pH-Indicator; dazu 2 ml 10fach verdünntes Bacto-Phytohämagglutinin P Difco Nr. 3110.

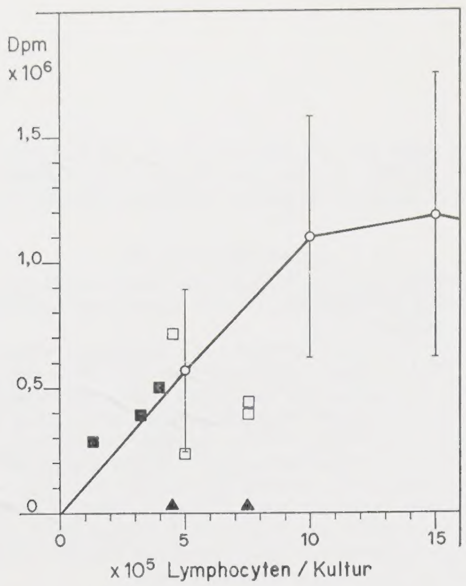

Abb. 1. Inkorporation von H^3-Thymidin in PHA-stimulierte Lymphocyten in Abhängigkeit von der Leukocytenzahl pro Kultur. ○ Mittelwerte bei normalen Spendern und 2 × Standardabweichung I ($N = 7$ bei 5×10^5 Lymphocyten pro Kultur), ($N = 11$ bei 10×10^5 Lymphocyten pro Kultur), ($N = 59$ bei 15×10^5 Lymphocyten pro Kultur), ($N = 21$ bei 20×10^5 Lymphocyten pro Kultur). ▲ Pat. G. B.: unbehandelte, granulocytenreiche Suspension (Lymphocyten/Gesamt-Leukocyten = 1:20). ■ Pat. G. B.: über Nylonwatte filtrierte, granulocytenarme Suspension (Lymphocyten/Gesamt-Leukocyten = 1:3). □ Kontrollen D. B. und E. B.

getrennt und in möglichst wenig (0,1—0,2 ml) „Hyamin“ (Packard) gelöst, mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (1 Liter Toluol + 4 g PPO + 0,5 g Dimethyl-POPOP) gemischt und schließlich im Flüssigkeitszähler (Tricarb Packard) gezählt. Die in cpm abgelesenen Werte wurden auf Grund der ausgerechneten Zählausbeute in absolute Dpm-Werte umgerechnet.

4. Resultate

Zahlreiche Versuche an Blutlymphocyten gesunder Spender ermöglichten die Ausschaltung vieler labortechnischer Störfaktoren, welche eine Verminderung der Stimulierbarkeit in vitro vortäuschen können. Unter Berücksichtigung aller dieser bekannten Störfaktoren wurde der mittlere Normbereich bei 70 gesunden Spendern für die beschriebene Methode ermittelt (Abb. 1).

Die Einbaurate für H^3-Thymidin nimmt bei normalen Blutspendern proportional zur Lymphocytenzahl pro Kultur zu, bis sie bei 10^6 Zellen pro Kultur mit 1,1—1,2 · 10^6 Dpm ein Plateau erreicht; bei weiterer Erhöhung der Lymphocytenzahl wird die H^3-Inkorporation nicht mehr vermehrt.

Die Lymphocyten des Patienten G. B. (schwarz ausgefüllte Symbole) zeigen ein charakteristisches Verhalten: in „ungereinigten“ Ansätzen, die ca. 20 Granulocyten pro 1 Lymphocyten enthalten, wird sehr wenig H^3-Thymidin eingebaut (dreieckige Symbole). Dagegen inkorporieren die von der gleichen Blutentnahme stammenden Zellen normale H^3-Quantitäten, wenn die Granulocyten vor der Inkubation weitgehend (bis zur Relation 1:1) entfernt werden. Die Blutproben der Kontrollen D. B. und E. B. wurden nach gleichem Transport im gleichen Arbeitsgang inkubiert und ausgezählt. (Tabellen mit den genauen Zahlen können von Interessenten bei den Autoren angefordert werden.)

5. Diskussion

Diese Ergebnisse beweisen, daß die Lymphocyten des Patienten G. B. durch PHA normal stimuliert werden, wenn die Kulturen relativ wenige Granulocyten enthalten. Die von verschiedenen Autoren [3, 6, 7] geäußerte Annahme einer mangelhaften Immunkompetenz der Lymphocyten dieser Patienten wird dadurch widerlegt; vielmehr ist der Patient in seinen cellulären immunologischen Funktionen aus rein quantitativen Gründen, d.h. wegen der schweren Lymphopenie, beeinträchtigt.

Eine Erklärung für die verminderte Thymidin-Inkorporation in Anwesenheit eines 10—20fachen Überschusses an Granulocyten und Monocyten muß verschiedene Faktoren berücksichtigen:

1. Wir beobachteten ein rasches Absinken des pH. Bei dem innerhalb der ersten 24 Std einsetzenden massiven Zerfall der Granulocyten wird ihr stark saurer Zellinhalt (pH in der Phagocytosevacuole um 2) freigesetzt. Diese Ansäuerung allein, eher aber zusammen mit den gleichzeitig freigesetzten Granulocyten-Hydrolasen, könnte die Lymphocytentransformation hemmen. Für die alkalische Phosphatase ist eine solche Hemmung der Thymidin-Inkorporation direkt nachgewiesen worden [8].

2. Ferner könnte die Veränderung der räumlichen Beziehungen der Lymphocyten zueinander als Folge des Überwiegens der Granulocyten der Thymidin-Aufnahme abträglich sein.

3. Umgekehrt könnte die Filtration durch Nylonwatte die Lymphocyten stimulieren. Dagegen ist einzuwenden, daß PHA auf Grund zahlreicher Untersuchungen als maximaler Stimulus gilt, der praktisch alle Lymphocyten zur Transformation veranlaßt. Die Nylon-Filtration kann also nur einen Hemmfaktor beseitigen.

Außer den erwähnten Publikationen [3, 6, 7], die bei Thymusdysplasie ein Fehlen der Lymphocytenstimulierbarkeit durch PHA annehmen, gibt es auch Angaben über intermediäre oder normale Befunde [2, 5]. Bach fand, daß allogene Zellen, die in seinem Einbahn-Verfahren mit denen des Patienten kokultiviert wurden, in Einzelfällen stärker stimulierten als PHA [1]. Er behauptete, daß auf diesem Wege die beiden genetischen Formen der kombinierten Immunmangelkrankheit voneinander differenziert werden könnten: bei der autosomal-recessiven Form (Swiss type) sollten die Lymphocyten weder durch PHA noch durch fremde Zellen stimuliert werden können, während sie bei der X-chromosomal vererbten Form (Gitlin type) zwar nicht auf PHA, wohl aber auf allogene Zellen reagieren sollten. — Andere Autoren [3, 5] konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Da sie ohne Berücksichtigung der hier ausführlich geschilderten Relations-Verschiebungen zwischen den verschiedenen Leukocytenarten gewonnen wurden, halten auch wir einen technischen Fehler für wahrscheinlicher als faktische Unterschiede.

Literatur

1. Bach, F. H., Voynow, N. K.: One-way stimulation in mixed leucocytes cultures. Science **153**, 545 (1966).
2. Dooren, L. J., Vries, M. J. de, Bekkum, D. W. van, Cleton, F. J., Koning, J. de: Sex-linked thymic epithelial hypoplasia in two siblings. J. Pediat. **72**, 51 (1968).
3. Greenberg, A. H., Ray, M., Tsai, Y. T.: Thymic alymphoplasia and dysgammaglobulinemia type I. J. Pediat. **75**, 95 (1969).
4. Hitzig, W. H., Landolt, R., Müller, G., Bodmer, P.: Heterogeneity of phenotypic expression in a family with Swiss type of agammaglobulinemia: Observations on the acquisition of agammaglobulinemia. J. Pediat. (im Druck).
5. Leikin, S., Purugganan, G., Chandra, R.: Thymic dysplasia. J. Pediat. **75**, 229 (1969).
6. Meuwissen, H. J., Bach, F. H., Hong, R., Good, R. A.: Lymphocyte studies in congenital thymic dysplasia: the one-way stimulation test. J. Pediat. **72**, 177 (1968).
7. Rosen, F. S.: The lymphocyte and the thymus gland. Congenital and hereditary abnormalities. New Engl. J. Med. **279**, 643 (1968).
8. Rubini, J. R., Keller, S., Sue McCall, M.: Inhibition of tritiated thymidine incorporation into DNA by alkaline phosphatase preparations. Cancer Res. **24**, 655 (1964).

Prof. Dr. W. H. Hitzig
Dr. P. Bodmer
Universitäts-Kinderklinik
Kinderspital Zürich
Immunchemisches Laboratorium
CH-8032 Zürich
Steinwiesstraße 75

Universitätsdruckerei H. Stürtz AG, Würzburg
Printed in Germany

Curriculum vitae

Geboren am 1. 6. 1936 in Bern, Bürger von Maur (ZH). Primarschule und Gymnasium in Lyon (Frankreich): Baccalauréat 1955. Chemiestudium an der ETH: Diplom 1960. Eidgenössische Matur 1960. Medizinstudium an der Universität Zürich mit Ausnahme eines klinischen Semesters in Lausanne. Staatsexamen 1966.

Seither Assistenzarzttätigkeit auf der Kinderabteilung der Schweizerischen Pflegerinnenschule, an der Kinderklinik des Kantonsspitals Winterthur und an der Universitätskinderklinik in Zürich, davon ein Jahr wissenschaftliche Tätigkeit im immunochemischen Laboratorium der Universitätskinderklinik Zürich. Dort Bearbeitung des Dissertationsthemas im Rahmen eines größeren Nationalfonds-Forschungsprojektes.